

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20256193

· 论 著 ·

莫诺拉韦在体外/体内抗 H1N1 流行性感冒病毒感染特点的研究

冯茜莉^{1,2}, 王进千^{1,2}, 杨宣叶^{1,2}, 胡欣妍^{1,2}, 丁玉林³, 马晓霞^{1,2}

(1. 西北民族大学生物医学研究中心生物工程与技术国家民委重点实验室, 甘肃 兰州 730030; 2. 西北民族大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730010; 3. 内蒙古农业大学兽医学院农业农村部动物疾病临床诊疗技术重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018)

[摘要] **目的** 分析莫诺拉韦在体内和体外对流行性感冒(流感)病毒的抗病毒效果。**方法** 检测莫诺拉韦对流感病毒 H1N1 PR8 毒株在体外和体内的抗病毒能力。以人源非小细胞肺癌细胞系(A549 细胞)作为 PR8 感染的体外模型,采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)、免疫印迹试验(WB)、噬斑的方法,分析莫诺拉韦体外对病毒复制、蛋白合成及病毒颗粒形成方面的抗病毒效果。以 PR8 滴鼻感染 C57BL/6 雌性小鼠为体内感染模型,分别从病毒载量、病理变化及免疫组化方面,对对照组、给药组、接毒组和接毒-给药组进行检测,以评估莫诺拉韦的抗病毒能力。**结果** 体外试验结果显示,莫诺拉韦对流感病毒的复制、蛋白合成及病毒颗粒形成没有明显抑制作用(均 $P>0.05$)。小鼠体内试验结果显示,与单纯感染 H1N1 小鼠相比,接受莫诺拉韦治疗的小鼠肺组织病毒载量明显下降,病理变化程度较轻,免疫组化检测显示核蛋白(NP)抗原信号明显减弱,干扰素(IFN)- α 、白细胞介素(IL)-4 和 IL-6 在肺中的表达水平较低(均 $P<0.01$)。**结论** 作为具有抗病毒活性的前体物,莫诺拉韦无法在体外培养的肺源细胞中发挥抗病毒活力,但可以在宿主体内转化为活性形式,显著降低 H1N1 流感病毒在肺增殖的能力,进而减轻病毒对肺组织的损伤。

[关键词] 莫诺拉韦; 流行性感冒; 抗病毒; 感染模型; 病理变化; H1N1

[中图分类号] R181.3⁺2 R511.7

Characteristics of molnupiravir in anti-H1N1 influenza virus infection *in vitro* and *in vivo*

FENG Xili^{1,2}, WANG Jinqian^{1,2}, YANG Xuanye^{1,2}, HU Xinyan^{1,2}, DING Yulin³, MA Xiaoxia^{1,2} (1. Key Laboratory of Bioengineering and Biotechnology of State Ethnic Affairs Commission, Biomedical Research Center, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China; 2. College of Life Science and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730010, China; 3. Key Laboratory of Clinical Diagnosis and Treatment Technology in Animal Diseases, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the antiviral effect of molnupiravir against influenza virus *in vitro* and *in vivo*. **Methods** The antiviral ability of molnupiravir against influenza virus strain H1N1 PR8 was detected *in vitro* and *in vivo*. Human non-small cell lung cancer cell line (A549 cells) was used as an *in vitro* model of PR8 infection. The antiviral effects of molnupiravir on virus replication, protein synthesis, and viral particle formation were analyzed using real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR), Western blot (WB) assay, and plaque assay. PR8 nose-dripping infected C57BL/6 female mice were used as an *in vivo* infection model. The antiviral ability of molnupiravir was evaluated by detecting viral load, pathological changes, and immunohistochemistry in

[收稿日期] 2024-09-06

[基金项目] 甘肃省自然科学基金项目(20JR5RA505)

[作者简介] 冯茜莉(1997-),女(汉族),山西省长治市人,硕士研究生在读,主要从事病毒基因工程研究。

[通信作者] 马晓霞 E-mail: maxiaoxia956@163.com

the control group, administration group, inoculation group, and inoculation-administration group. **Results** *In vitro* test results showed that molnupiravir had no significant inhibitory effect on influenza virus replication, protein synthesis, and virus particle formation (all $P > 0.05$). *In vivo* test results showed that compared with mice infected with H1N1 alone, the viral load in the lung tissue of mice treated with molnupiravir declined significantly, and the extent of pathological changes was milder. Immunohistochemical detection showed a significant weakening in nuclear protein (NP) antigen signal, and the expression levels of interferon (IFN)- α , interleukin (IL)-4, and IL-6 in the lungs were lower (all $P < 0.01$). **Conclusion** As a precursor with antiviral activity, molnupiravir can not exert antiviral activity in lung-derived cells cultured *in vitro*, but can be transformed into an active form in the host, which significantly decreases the ability of H1N1 influenza virus to proliferate in the lungs and thereby alleviates the damage of virus to lung tissue.

[**Key words**] molnupiravir; influenza; antiviral; infection model; pathological change; H1N1

流行性感冒(流感)病毒作为副黏病毒科的一员,其基因组主要编码血凝素(hemagglutinin, HA)、神经氨酸酶(neuraminidase, NA)、核蛋白(nucleoprotein, NP)、基质蛋白 1(matrix protein 1, M1)、基质蛋白 2(matrix protein 2, M2)、非结构蛋白 1(nonstructural protein 1, NS1)、非结构蛋白 2(nonstructural protein 2, NS2)、聚合酶酸性蛋白(polymerase acid protein, PA)、聚合酶碱性蛋白 1(polymerase basic protein 1, PB1)、聚合酶碱性蛋白 2(polymerase basic protein 2, PB2)等十余种蛋白质。流感是由流感病毒引起的严重的具有传染性的呼吸道疾病^[1]。使用抗病毒药物进行治疗可以有效降低流感发病率和病死率。在流感病毒复制过程中发挥着关键作用的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RNA dependent RNA polymerase, RdRp)高度保守,因此成为人们研发抗流感病毒药物的常见靶标^[2]。

作为一种新型的口服抗病毒药物,莫诺拉韦具有抵抗包括新型冠状病毒(新冠)病毒在内的多种 RNA 病毒感染的活性。莫诺拉韦作为一种核糖核苷酸类似物,可以在病毒依赖 RdRp 进行基因组复制时,使病毒 RNA 基因组发生不可逆突变,导致其无法产生子代病毒或产生无感染能力的子代病毒,最终发挥抗病毒功能^[3-4]。根据莫诺拉韦的特性,认为该药物同样可以干扰流感病毒 RdRp 合成病毒 RNA 的活性,从而达到抗流感病毒的目的。

当流感病毒感染宿主后,宿主免疫系统及时激活并起始相关的抗病毒反应。干扰素(interferon, IFN)是抗病毒细胞因子中的急先锋。此外,流感病毒感染宿主细胞后也会促使细胞发生炎症反应,白细胞介素(interleukin, IL)-4 和 IL-6 在流感病毒促使细胞产生炎症反应中发挥重要调控作用^[5-8]。目前,季节性 H1N1 流感病毒与严重急性呼吸综合征冠状病毒 2(SARS-CoV-2)在人群中的传播仍严

重威胁全世界的公共卫生安全,并且二者在流行区域具有较高的混合感染风险^[9-10]。本研究分别利用 A549 细胞和 C57BL/6 雌性小鼠作为 PR8 在体外和体内感染的试验模型,评价莫诺拉韦在体外和体内的抗流感病毒活性,进一步了解该抗病毒药物的生物学活性,为今后在临床上使用莫诺拉韦治疗 H1N1 流感病毒单纯感染或者与 SARS-CoV-2 混合感染提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、小鼠和病毒毒株 A549 细胞、犬肾上皮细胞(MDCK 细胞)、人肝癌细胞(Huh7 细胞)以及甲型流感病毒 A/PR/8/34 株[influenza A virus A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)],以下简称 PR8]均由本实验室保存。C57BL/6 雌性小鼠购自中国农业科学院兰州兽医研究所。

1.2 主要试剂 莫诺拉韦购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;DMEM 培养基和 0.25%胰酶-EDTA 购自兰州百灵生物技术有限公司;胎牛血清购自兰州民海生物工程有限公司;胰酶、低熔点琼脂糖和山羊抗兔二抗购自美国 Sigma 公司;Trizol、4%多聚甲醛、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒、增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂以及无酶无菌水(DNase/RNase-free ddH₂O)购自兰杰柯科技有限公司;氯仿、异丙醇、无水乙醇和无水甲醛购自天津市富宇精细化工有限公司;结晶紫、噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)试剂盒购自索莱宝科技有限公司;反转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)试剂盒购自诺唯赞生物科技股份有限公司;兔源甲型流感(influenza A virus, IAV)抗体购自 GeneTax 公司;

兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司;蛋白裂解液(radio immunoprecipitation assay, RIPA)购自碧云天生物技术有限公司。

1.3 细胞培养与传代 将 A549 细胞和 MDCK 细胞在含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中正常培养于 5% CO₂ 的 37℃ 细胞培养箱。当细胞汇合度达到 90% 以上时,用无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)轻柔清洗,而后用 0.25% 胰酶-EDTA 对细胞进行消化处理。胰酶消化处理后的细胞培养物按照试验计划进行正常细胞传代培养或者用于后续相关试验。

1.4 莫诺拉韦体外抗病毒特性分析

1.4.1 莫诺拉韦对病毒感染细胞的处理 为确定莫诺拉韦对特定细胞活性的影响,采用 MTT 法分别检测不同浓度莫诺拉韦对 A549 细胞和 Huh7 细胞的毒性作用^[11-12],并确定莫诺拉韦对 A549 细胞的处理浓度。将所有细胞分为对照组、接毒组和接毒-给药组。使用感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 0.1 的 PR8 对汇合度约为 80% 的 A549 细胞进行感染。待病毒在 A549 细胞中吸附 2 h 后弃去细胞培养液,用无菌 PBS 轻柔清洗 3 次,以洗去未吸附的病毒。在接毒-给药组中加入含有莫诺拉韦(30 μmol/L)和 TPCK 胰酶(2 μg/mL)的 DMEM 培养基。对照组及接毒组的培养基成分不含莫诺拉韦,其他成分与接毒-给药组一致。分别在 6、8、10、12 h 收集 A549 细胞与细胞培养液,并于 -80℃ 保存,用于后续试验。

1.4.2 莫诺拉韦对流感病毒在 A549 细胞中增殖影响的分析 将不同时间点收集的 A549 细胞采用 Trizol 法提取总 RNA,反转录后进行 qRT-PCR 检测,相关试验操作参考试剂盒说明书进行。使用 RIPA 细胞裂解液冰上裂解上述收集的细胞,离心收集上清,即为细胞总蛋白。按 BCA 试剂盒说明书对细胞总蛋白定量分析,用于检测病毒不同蛋白在 A549 细胞中的表达水平。使用 ECL 化学发光试剂盒对目标蛋白进行显影分析。为评估 A549 细胞中流感病毒产生具有感染性子代病毒颗粒水平的变化情况,使用 MDCK 细胞进行病毒噬斑试验。使用 DMEM 培养基梯度稀释 PR8 感染 A549 细胞的上清液。在 6 孔板中,分别加入 1 mL A549 细胞培养病毒的上清液至汇合度约为 95% 的 MDCK 细胞,于细胞培养箱中孵育 2 h。用 PBS 溶液配置浓度为

1% 的低熔点琼脂糖,以 1:1 的比例与 DMEM 混合。弃去培养基后,将 3 mL 含有终浓度为 2 μg/mL TPCK 酶的低熔点琼脂糖的细胞培养基铺于细胞表面(不得产生气泡),倒置于细胞培养箱中培养。显微镜下观察细胞病变情况,出现明显细胞病变后使用 4% 多聚甲醛固定 1 h。而后,自来水冲去低熔点琼脂糖,并使用 1% 的结晶紫溶液染色 15 min,清水冲洗后可见未被染色的斑点即为流感病毒感染 MDCK 细胞产生的病毒噬斑。

1.5 莫诺拉韦体内抗病毒特性分析

1.5.1 C57BL/6 雌性小鼠接毒及给药试验 将 5 周龄 C57BL/6 雌性小鼠随机分为 4 组,即对照组、给药组、接毒组和接毒-给药组,每组 9 只。参照针对 C57BL/6 雌性小鼠滴鼻接种 PR8 毒株的试验操作方法^[13]对接毒组和接毒-给药组小鼠进行滴鼻感染,其他试验组的小鼠以同样的操作方法用 PBS 进行滴鼻处理。相关动物试验操作均符合内蒙古农业大学科学研究与学术伦理道德专门委员会关于试验动物伦理学所设置的各种要求和标准(NDYB2018-5)。给药组和接毒-给药组小鼠滴鼻 24 h 后,使用莫诺拉韦(剂量为 50 mg/kg 体重)对小鼠每 12 h 进行一次灌胃处理,其他组小鼠以同样方式灌服 PBS,连续进行 6 次后正常饲养,一周后将小鼠实施安乐死。

1.5.2 检测肺中 PR8 的增殖情况 将小鼠实施安乐死后,摘取适量肺组织。利用 Trizol 法提取肺组织总 RNA,反转录为 cDNA,并用 qRT-PCR 检测 PR8 病毒基因及 IFN-α、IL-4、IL-6 转录水平的变化。所用引物信息见表 1。

表 1 qRT-PCR 反应引物

Table 1 The primers for qRT-PCR reaction

引物	序列 (5'-3')
Humo-GAPDH-F	CTCTGGTAAAGTGGATATTGT
Humo-GAPDH-R	GGTGAATCATATTGGAACA
IAV-PB1-F	ATGGAATATGACGCTGTTG
IAV-PB1-R	TTGGCTTGTGTTGAGAATAG
Mouse-GAPDH-F	AGGTCGGTGTGAACGGATTG
Mouse-GAPDH-R	GGGGTCGTTGATGGCAACA
Mouse-IFN-α-F	ATGGCTAGGCCCTTTGCTTTC
Mouse-IFN-α-R	CAGTTCCTTCATCCCACCAG
Mouse-IL-4-F	GGTCTCAACCCCCAGCTAGT
Mouse-IL-4-R	GCCGATGATCTCTCTCAAGTGAT
Mouse-IL-6-F	GGCGGATCGGATGTTGTGAT
Mouse-IL-6-R	GGACCCCAGACAATCGGTTG

1.5.3 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色法检测肺组织病变情况 取适量肺组织,用生理盐水冲洗并吸干水分,保存于 10%的甲醛溶液中。石蜡包埋制作组织切片并采用 HE 染色法进行切片染色^[14]。染色后的切片进行封片并在显微镜下观察肺组织的病理变化。

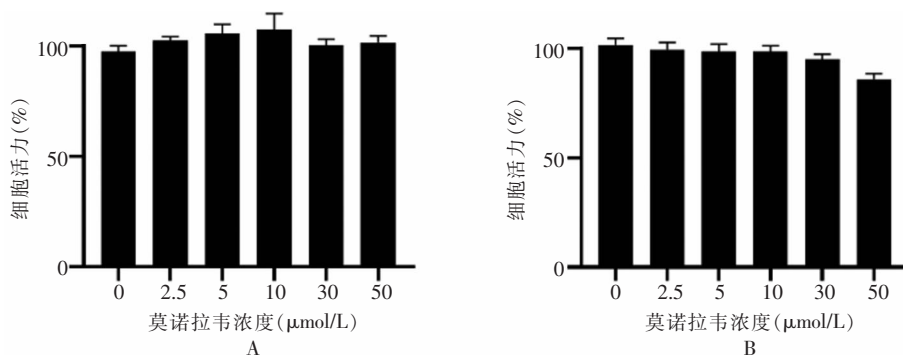
1.5.4 免疫组化法评测病毒在肺组织中的含量变化 对小鼠肺组织切片进行脱蜡、水化处理,加入适量内源性过氧化物酶阻断剂去除内源性过氧化物酶进行抗原修复。根据组织大小,滴加 100 μL 兔源抗流感病毒 NP 蛋白的一抗稀释液(1:400),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育,PBS 清洗 3 次,每次 3 min。滴加 100 μL 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗稀释液(1:800),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min,PBS 清洗 3 次。加入适量新鲜配置的二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色液,室温孵育 5~8 min,使用去离子水清洗组织。最

后,使用苏木精染色液孵育 20 s 后制作组织切片。

1.6 统计学分析 所有试验均独立重复 3 次,所有数据结果均以平均值 \pm 标准差的形式呈现。组间比较采用 GraphPad Prism 9.0 软件中内嵌的 ANOVA 算法进行分析。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 莫诺拉韦对 A549 细胞的影响 MTT 法检测不同浓度的莫诺拉韦对 A549、Huh7 细胞的毒性作用结果显示,与对照组相比,莫诺拉韦的浓度从 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 递增至 50 $\mu\text{mol/L}$ 时,均无明显的细胞毒性作用,其细胞活力均在 80% 以上,推测此药物在一定浓度范围内对肺源细胞及肾源细胞的毒性微弱,适宜开展体外/内药物抗病毒试验。见图 1。



注:A为 A549 细胞,B为 Huh7 细胞。

图 1 莫诺拉韦细胞毒性检测结果

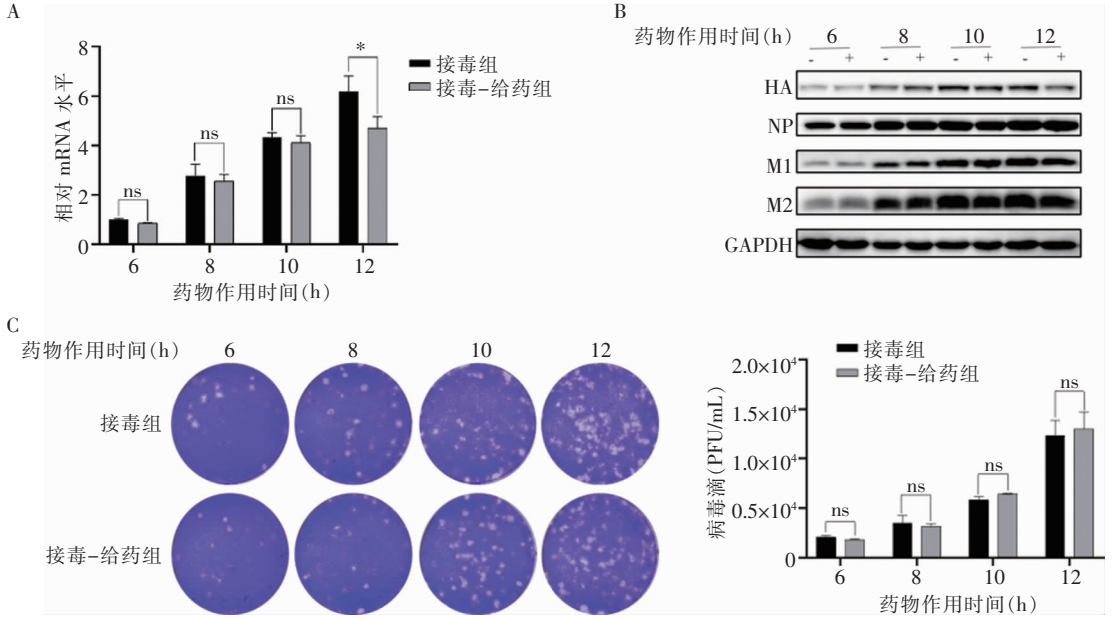
Figure 1 Cytotoxicity detection of molnupiravir

2.2 莫诺拉韦体外对 PR8 毒株的抗病毒作用 在 A549 细胞中,莫诺拉韦处理 6、8、10、12 h 后,接种-给药组流感病毒载量数值比接种组略有降低,但两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)(图 2A),且病毒 HA、NP、M1 和 M2 蛋白的表达水平也无明显降低(图 2B)。在 MDCK 细胞中进行病毒噬斑试验分析莫诺拉韦对 PR8 在 A549 细胞中释放出的子代病毒的影响,结果显示接种-给药组中病毒噬斑数与接种组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)(图 2C),说明莫诺拉韦不能抑制 A549 细胞中 PR8 子代病毒的释放。

2.3 莫诺拉韦对小鼠肾及肝的毒性影响 体外试验显示,莫诺拉韦对肺源细胞和肾源细胞毒性轻微,为检测其对小鼠的不良反应,将莫诺拉韦溶于 PBS

后对小鼠进行重复灌胃后,取小鼠肾和肝,通过 HE 染色检测其病理变化。结果显示,灌服莫诺拉韦组小鼠的肾及肝与对照组相比并无明显病理变化(图 3),提示该药物在一定浓度范围内对小鼠机体无明显毒性作用。

2.4 莫诺拉韦对小鼠肺组织中流感病毒复制的影响 小鼠肺组织 RNA qRT-PCR 检测结果显示,未接种的对照组小鼠与给药组的小鼠未检测出病毒载量,表明该检测体系具特异性,无非特异性扩增事件。接种组小鼠滴鼻感染病毒一周后,其病毒载量仍维持较高水平;与接种组小鼠病毒载量相比,连续灌服莫诺拉韦 3 d 的接种-给药组小鼠肺组织中病毒载量明显降低($P < 0.01$),且为较低水平(图 4)。



注:A为流感病毒 mRNA 表达水平;B为流感病毒蛋白表达水平;C为流感病毒颗粒水平(左图为病毒噬斑图,右图为噬斑统计图)。*表示 $P < 0.05$, ns 表示 $P > 0.05$ 。

图 2 莫诺拉韦处理不同时长对 PR8 毒株在 A549 细胞中复制的影响

Figure 2 Effect of molnupiravir treatment duration on PR8 strain replication in A549 cells

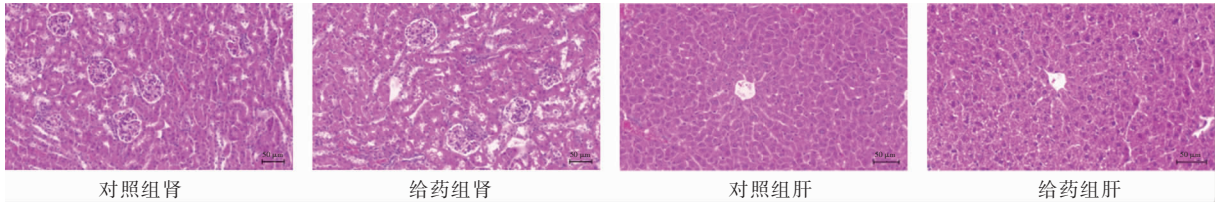
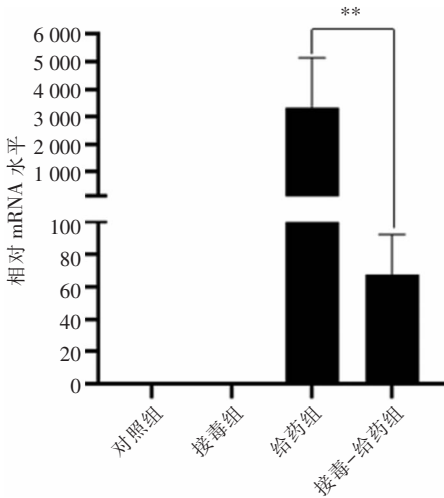


图 3 莫诺拉韦对小鼠肾和肝的影响

Figure 3 Effect of molnupiravir on lung and liver in mice



注:**表示 $P < 0.01$ 。

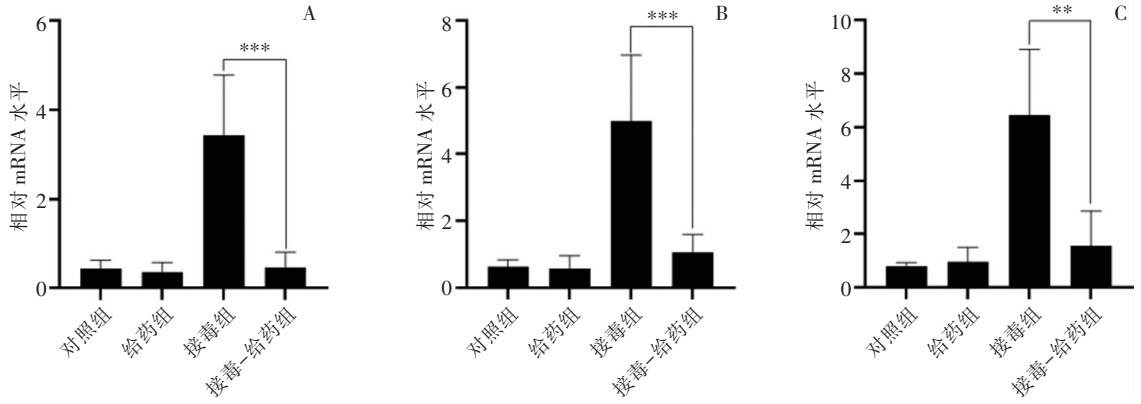
图 4 莫诺拉韦对 PR8 毒株在小鼠肺中增殖的影响

Figure 4 Effect of molnupiravir on PR8 proliferation in mice lung

2.5 莫诺拉韦对病毒感染小鼠肺中炎症因子表达的影响 为评估莫诺拉韦在抵抗流感毒株肺组织内增殖过程中固有免疫及炎症反应的变化情况,采用 qRT-PCR 检测 IFN- α 、IL-4 和 IL-6 在小鼠肺组织中的转录水平变化,结果表明,虽然未接毒小鼠单纯灌服莫诺拉韦后出现 IFN- α 、IL-4 和 IL-6 转录水平的波动,但与对照组小鼠比较,差别无统计学意义 ($P > 0.05$)。此外,与接毒组小鼠比较,接毒-给药组小鼠肺组织中 IFN- α ($P < 0.001$)、IL-4 ($P < 0.001$) 和 IL-6 ($P < 0.01$) 的转录水平明显降低。见图 5。

2.6 莫诺拉韦对病毒感染小鼠肺病理变化的影响

对比观察对照组小鼠与给药组小鼠肺组织结构特征发现,单纯灌服莫诺拉韦的小鼠肺无明显病理变化,呈现正常的生理结构特征,说明莫诺拉韦未对小鼠肺组织造成实质性损伤,无明显不良反应。与对照组小鼠肺组织比较,接毒组小鼠肺组织中肺泡结构破坏严重,肺细支气管炎症反应特征明显,含有大



注:A为 IFN- α mRNA 转录水平;B为 IL-4 mRNA 转录水平;C为 IL-6 mRNA 转录水平。 ** 表示 $P < 0.01$, *** 表示 $P < 0.001$ 。

图 5 病毒感染小鼠肺组织中炎症因子 mRNA 转录水平

Figure 5 mRNA transcription levels of inflammatory factors in lung tissue of virus-infected mice

量炎性细胞浸润,并且形成明显的“管套”现象。与接毒组小鼠相比,接毒-加药组小鼠肺细支气管炎

症反应程度明显减弱,炎性细胞浸润程度有所降低。见图 6。

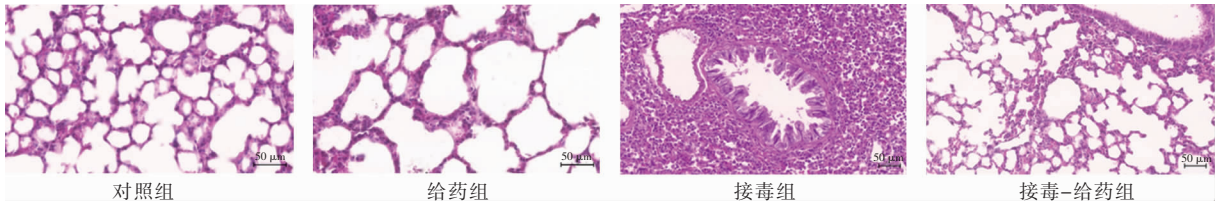


图 6 莫诺拉韦对 PR8 毒株在小鼠肺致病性的影响

Figure 6 Effect of molnupiravir on the pathogenesis in PR8-infected mice lung

2.7 莫诺拉韦对 PR8 在小鼠肺中增殖的抑制效果
免疫组化检测结果未发现对照组小鼠肺组织存在非特异阳性信号(图 7A);给药组呈现的结果与对照组相似(图 7B);与对照组相比,接毒组小鼠细支气管上皮细胞中存在大量 PR8 毒株感染的阳性信号

(棕色标记物)(图 7C),而接毒-加药组小鼠肺泡支气管组织中的阳性信号明显减弱(图 7D),与莫诺拉韦治疗 PR8 感染小鼠的病毒载量降低相符(图 4),进一步证明了莫诺拉韦在小鼠体内能够发挥抗流感病毒感染的生物学活性。

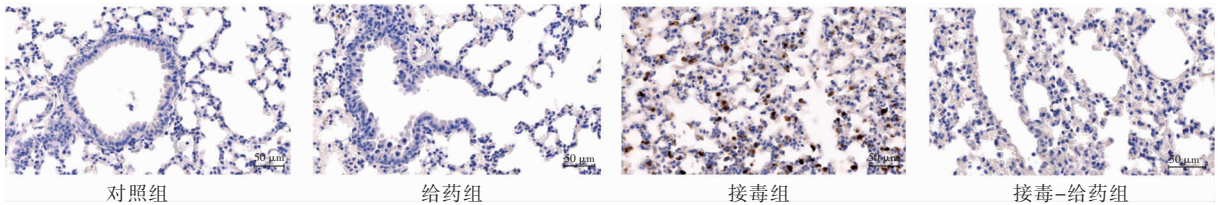


图 7 免疫组化检测莫诺拉韦对 PR8 毒株感染小鼠肺的影响

Figure 7 Effect of molnupiravir on PR8-infected mice lung detected by immunohistochemistry

3 讨论

目前,莫诺拉韦作为一种临床治疗新冠病毒感染患者的抗病毒药物已经被广泛应用。对于依旧在

全球肆虐的流感病毒来说,寻找一种具有潜在抵抗新冠和流感双重威胁的口服药物具有重要的临床意义。基于莫诺拉韦的抗病毒机制,其能否有效转变为具有抗病毒功能的活性形式至关重要。现已知血液中存在大量能够将莫诺拉韦有效转化为 N-羟基

胞苷[N (4)-hydroxycytidine, NHC]的宿主酯酶。羧酸酯酶是一种高效水解酶,人体中主要有羧酸酯酶-1(carboxylesterases 1, CES1)和羧酸酯酶-2(carboxylesterases 2, CES2)两种酶^[15], CES1 主要分布在肝和肺,肠道中几乎没有,而 CES2 在肠、肝和肾中大量表达^[16]。肺作为流感病毒感染的靶器官,其组织细胞是否能有效地将莫诺拉韦转变为 NHC 是一个需要探究的问题。本研究使用 A549 细胞模拟人源肺细胞,并使用 PR8 建立病毒体外感染模型。莫诺拉韦直接作用于感染 PR8 的 A549 细胞后,无论对病毒基因复制、蛋白合成还是病毒颗粒形成,均没有表现出抗病毒活性,提示 A549 细胞作为人源肺细胞,无法合成或缺乏足够量的宿主酯酶使莫诺拉韦转变为 NHC。此外,这两种酶的底物特异性也不同, CES1 优先水解酰基部分大于其烷氧基部分的酯, CES2 则与之相反^[17]。莫诺拉韦的酰基部分小于烷氧基部分,是 CES2 的选择性底物,而 A549 细胞可能由于缺乏 CES2 才无法将莫诺拉韦转化为活性形式。

虽然莫诺拉韦无法在体外实现抗病毒活性,但是小鼠口服莫诺拉韦却明显抑制了流感病毒在肺组织中的复制能力。小鼠灌服莫诺拉韦后,药物被肠道吸收并进入体液循环,在血液中被宿主酯酶高效转化为 NHC, NHC 进入肺组织细胞中发挥抗流感病毒的作用。流感病毒引起的严重并发症甚至死亡多因炎性细胞因子的过度产生最终形成细胞因子风暴,并非流感病毒本身引起。因此,抑制宿主的炎症反应可成为治疗流感病毒感染的有效策略。研究^[18]显示,由流感病毒引发的各种炎症与 IFN、IL-4、IL-6 等细胞因子过度产生有关。IL-4 是一种辅助型 T 细胞 2(T helper 2 cell, Th2)型免疫因子,当流感病毒入侵机体后,机体立即启动抗感染的免疫机制对病毒进行抵抗,其中促炎因子 IL-4 在流感病毒感染和炎症发生时发挥重要作用。在机体中性粒细胞发挥杀伤功能、吞噬作用及抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)时,IL-4 在其中扮演着重要的角色。IL-4 还可以增强 B 淋巴细胞介导的体液免疫反应,促进抗流感病毒抗体的产生。由巨噬细胞、树突状细胞、肥大细胞和其他先天免疫细胞产生的 IL-6 也是一种炎症标志物。临床研究^[19]表明,流感患者预后不良与 IL-6 表达量过高有密切关系。因此,本研究除了证明莫诺拉韦对小鼠感染流感病毒有较强的抗病毒活性外,还发现莫诺拉韦在

一定程度上与宿主免疫系统的细胞因子(如 IFN、IL-4、IL-6)基因转录水平有关。小鼠正常生理情况下服用莫诺拉韦不能明显影响这些基因转录水平的变化,但在抗流感病毒感染过程中可使 IFN、IL-4、IL-6 的转录水平降低(图 5)。当流感病毒被有效抑制后,小鼠肺组织中病毒含量的降低可能会引起 IFN 水平降低,这一现象可能与流感病毒诱导 IFN 合成具有剂量依赖性效应相关^[20]。值得注意的是,IL-4 和 IL-6 是参与炎症发生发展的重要调节因子,莫诺拉韦抑制流感病毒在肺中增殖的同时有效降低 IL-4、IL-6 基因的转录水平对于抑制肺炎发生发展十分重要。IL-4 作为典型的 II 型免疫细胞因子,具有免疫刺激和免疫抑制活性^[5]。IL-6 是一种重要的炎症因子,在成年小鼠中,IL-6 可以增强 T 细胞介导的抗流感的抗体应答^[21]。本研究结果显示,虽然莫诺拉韦能够有效降低肺中流感病毒的增殖,但肺组织细胞内仍然会发生炎症反应,莫诺拉韦无法避免流感病毒在增殖过程中对肺组织在一定程度上造成的损伤。本研究的局限性在于仅使用了单一的药物浓度,后续可以进一步优化并确定莫诺拉韦最佳用药浓度。虽然针对莫诺拉韦临床治疗效果及其不良反应还有很多亟待探究的问题^[22-24],但其有效抵抗流感病毒在宿主体内增殖能够为宿主自我调节和损伤组织(如肺)的自我修复提供契机。对莫诺拉韦在宿主体内抵抗流感病毒感染的抗病毒效果进行研究,有助于为流感病毒感染,甚至流感病毒与新冠病毒混合感染的临床治疗提供有价值的参考信息。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] Li JL, Zhang YF, Zhang XL, et al. Influenza and universal vaccine research in China[J]. Viruses, 2022, 15(1): 116.
- [2] Ghosh A, Panda P, Halder AK, et al. *In silico* characterization of aryl benzoyl hydrazide derivatives as potential inhibitors of RdRp enzyme of H5N1 influenza virus[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 1004255.
- [3] Tian LL, Pang ZH, Li MC, et al. Molnupiravir and its antiviral activity against COVID-19[J]. Front Immunol, 2022, 13: 855496.
- [4] Zhao YX, He G, Huang W. A novel model of molnupiravir against SARS-CoV-2 replication: accumulated RNA mutations to induce error catastrophe [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 410.
- [5] Peng Y, Wang XF, Wang H, et al. Interleukin-4 protects

- mice against lethal influenza and *Streptococcus pneumoniae* co-infected pneumonia[J]. Clin Exp Immunol, 2021, 205(3): 379–390.
- [6] You LS, Liu Y, Chen NC, et al. Influenza A (H1N1) virus induced long-term remission in a refractory acute myeloid leukaemia[J]. Br J Haematol, 2023, 202(4): 745–748.
- [7] Liu W, Ren XJ, Wang Q, et al. Pharmacological inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase by olaparib ameliorates influenza-virus-induced pneumonia in mice[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2021, 40(1): 159–167.
- [8] Lin WC, Lin CF, Chen CL, et al. Prediction of outcome in patients with acute respiratory distress syndrome by bronchoalveolar lavage inflammatory mediators [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2010, 235(1): 57–65.
- [9] Bai L, Zhao YL, Dong JZ, et al. Coinfection with influenza A virus enhances SARS-CoV-2 infectivity[J]. Cell Res, 2021, 31(4): 395–403.
- [10] Baek YB, Kwon HJ, Sharif M, et al. Therapeutic strategy targeting host lipolysis limits infection by SARS-CoV-2 and influenza A virus[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 367.
- [11] Jin L, Li YC, Pu FY, et al. Inhibiting pyrimidine biosynthesis impairs peste des petits ruminants virus replication through depletion of nucleoside pools and activation of cellular immunity [J]. Vet Microbiol, 2021, 260: 109186.
- [12] Chang QY, Guo FC, Li XR, et al. The IMPDH inhibitors, ribavirin and mycophenolic acid, inhibit peste des petits ruminants virus infection[J]. Vet Res Commun, 2018, 42(4): 309–313.
- [13] Li QC, Jiang ZM, Ren SN, et al. SRSF5-mediated alternative splicing of M gene is essential for influenza a virus replication; a host-directed target against influenza virus [J]. Adv Sci (Weinh), 2022, 9(34): e2203088.
- [14] 李红红, 廖林虹, 王茜, 等. 苯酚在病理技术苏木精-伊红染色法中对病理切片质量的影响[J]. 中国当代医药, 2024, 31(5): 25–28.
- Li HH, Liao LH, Wang Q, et al. Effect of phenol on the quality of pathological sections in pathological technique hematoxylin-eosin staining[J]. China Modern Medicine, 2024, 31(5): 25–28.
- [15] Song YQ, Jin Q, Wang DD, et al. Carboxylesterase inhibitors from clinically available medicines and their impact on drug metabolism[J]. Chem Biol Interact, 2021, 345: 109566.
- [16] Xie MX, Yang DF, Liu L, et al. Human and rodent carboxylesterases; immunorelatedness, overlapping substrate specificity, differential sensitivity to serine enzyme inhibitors, and tumor-related expression[J]. Drug Metab Dispos, 2002, 30(5): 541–547.
- [17] Shi DS, Yang J, Yang DF, et al. Anti-influenza prodrug oseltamivir is activated by carboxylesterase human carboxylesterase 1, and the activation is inhibited by antiplatelet agent clopidogrel[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 319(3): 1477–1484.
- [18] Gu YN, Zuo X, Zhang SY, et al. The mechanism behind influenza virus cytokine storm [J]. Viruses, 2021, 13(7): 1362.
- [19] Alagarasu K, Kaushal H, Shinde P, et al. TNFA and IL10 polymorphisms and IL-6 and IL-10 levels influence disease severity in influenza a(H1N1)pdm09 virus infected patients[J]. Genes (Basel), 2021, 12(12): 1914.
- [20] Wu WX, Metcalf JP. The role of type I IFNs in influenza; antiviral superheroes or immunopathogenic villains?[J]. J Innate Immun, 2020, 12(6): 437–447.
- [21] Dienz O, Rud JG, Eaton SM, et al. Essential role of IL-6 in protection against H1N1 influenza virus by promoting neutrophil survival in the lung[J]. Mucosal Immunol, 2012, 5(3): 258–266.
- [22] 李晓宇, 李芬, 赵淑娟, 等. 抗新型冠状病毒口服药: 莫诺拉韦[J]. 中国新药与临床杂志, 2023, 42(2): 119–122.
- Li XY, Li F, Zhao SJ, et al. Oral agent with activity against SARS-CoV-2: molnupiravir [J]. Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies, 2023, 42(2): 119–122.
- [23] 钱佩佩, 曹凯, 赵亮, 等. 基于 JADER 的莫诺拉韦不良事件信号检测与分析[J]. 现代药物与临床, 2023, 38(11): 2867–2871.
- Qian PP, Cao K, Zhao L, et al. Signal detection and analysis of adverse events related to molnupiravir based on Japanese Adverse Drug Event Report database[J]. Drugs & Clinic, 2023, 38(11): 2867–2871.
- [24] 张竞文, 许方婧伟, 张云涛. 新型冠状病毒肺炎口服药物莫诺拉韦及其对比分析[J]. 中国新药杂志, 2022, 31(21): 2144–2151.
- Zhang JW, Xufang JW, Zhang YT. Molnupiravir—an oral drug for COVID-19 and its comparative analysis[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2022, 31(21): 2144–2151.

(本文编辑: 翟若南)

本文引用格式:冯茜莉, 王进千, 杨宣叶, 等. 莫诺拉韦在体外/体内抗 H1N1 流行性感冒病毒感染特点的研究[J]. 中国感染控制杂志, 2025, 24(4): 478–485. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20256193.

Cite this article as: FENG Xili, WANG Jinqian, YANG Xuanye, et al. Characteristics of molnupiravir in anti-H1N1 influenza virus infection *in vitro* and *in vivo*[J]. Chin J Infect Control, 2025, 24(4): 478–485. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20256193.